

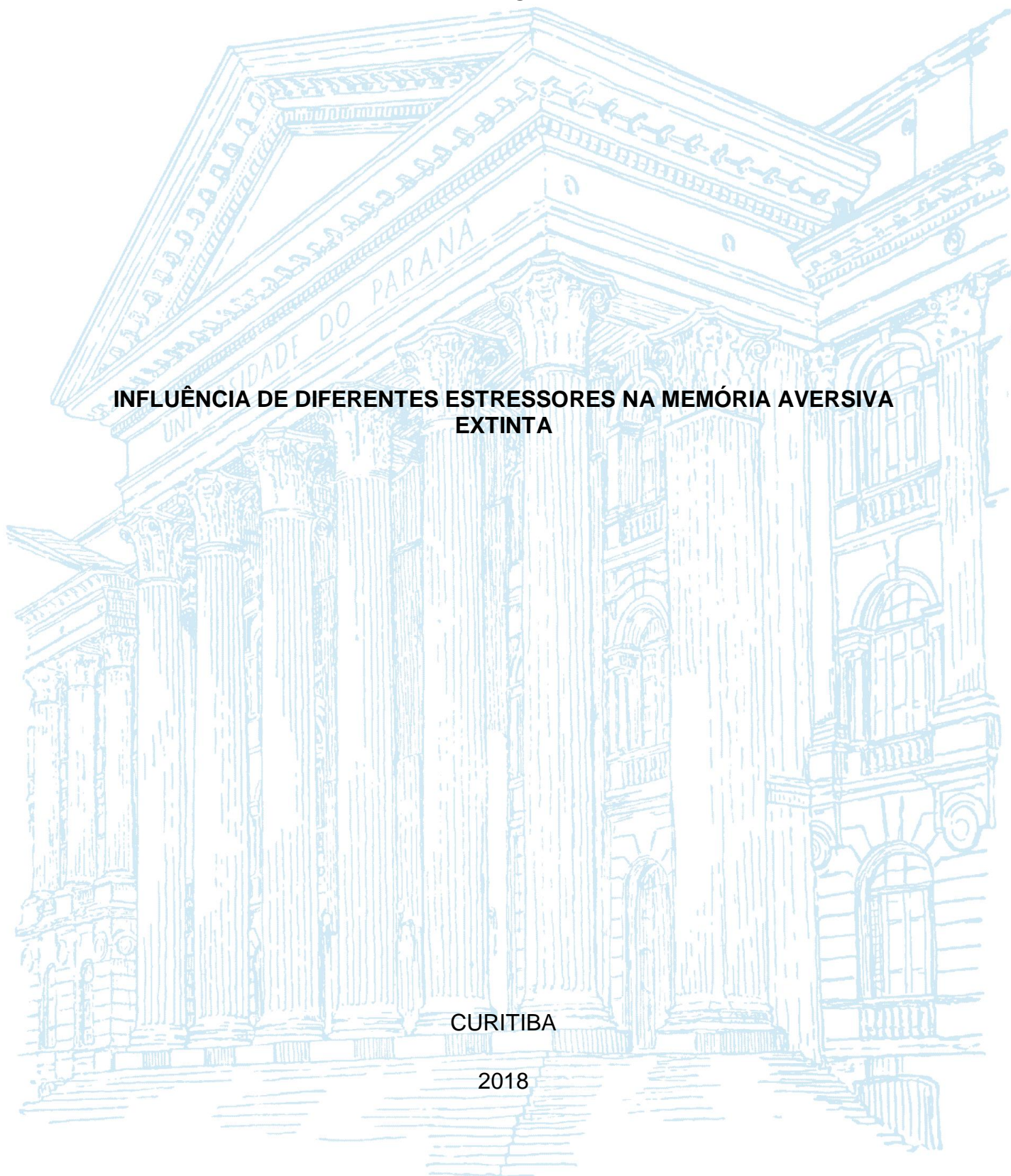
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARINA SAADE

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTRESSORES NA MEMÓRIA AVERSIVA
EXTINTA**

CURITIBA

2018



MARINA SAADE

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTRESSORES NA MEMÓRIA AVERSIVA
EXTINTA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Biomedicina da Universidade
Federal do Paraná como requisito à
obtenção do título de obtenção do
grau de Bacharel em Biomedicina

Orientador: Profº. Dr. Bruno Jacson
Martynhak

CURITIBA

2018

RESUMO

O modelo de memória aversiva em ratos é utilizado para estudo de alguns transtornos de ansiedade, como o Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT). O TEPT é um transtorno psiquiátrico que atinge uma grande parcela da população e afeta a vida cotidiana de seus pacientes. Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência de diferentes estressores não associados, relacionados ou da mesma natureza do contexto sobre uma memória aversiva extinta em ratos, procurando estabelecer uma forma de redução da memória aversiva em roedores com menor incidência de recuperação espontânea. Para isso, ratos Wistar machos foram condicionados ao contexto: os animais receberam cinco choques nas patas em uma caixa de condicionamento. No dia seguinte passaram pela sessão de extinção, que é realizada pela reexposição do animal a uma sessão de 30 minutos na caixa de condicionamento sem a presença de estímulo aversivo. Grupos independentes de animais foram expostos ao estresse em diferentes momentos: uma hora ou dois dias após a extinção. Os resultados mostram que os estressores não associados ou relacionados ao contexto não tiveram influência sobre a resposta de medo dos animais nos testes. O estresse da mesma natureza do condicionamento teve a capacidade de reinstaurar a resposta de medo nos animais. Esses resultados, ao comparados com a literatura, sugerem que a natureza e o momento em que o estressor é aplicado resultam em diferentes respostas do animal frente ao contexto. Os resultados deste trabalho podem vir a influenciar a forma como é realizada a terapia para pacientes que sofrem do Transtorno do Estresse Pós-Traumático.

Palavras-chave: constrição, estressor, medo, choque, condicionamento

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) é um transtorno que pode se desenvolver depois de um evento traumático. Antes classificado como um transtorno de ansiedade pelo DSM-IV (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Psiquiátrica Americana) (APA, 2013), o TEPT agora é classificado no grupo de Trauma e Transtornos Relacionados ao Estresse, de acordo com o DSM-V. Seus principais sinais podem ser divididos em três grupos: a revivescência do evento traumático através de memórias intrusivas, flashbacks ou sonhos; esquiva de estímulos que lembram o trauma; entorpecimento emocional e hiperestimulação autonômica (hipervigilância, insônia, irritabilidade, sobressalto excessivo entre outros sinais). Estes sintomas podem aparecer meses depois do evento traumático e devem ser severos o suficiente para interferir em importantes áreas da vida do indivíduo, como em aspectos sociais e ocupacionais.

Como consequência do trauma, o paciente que sofre com TEPT tem uma reação exacerbada a estressores brandos e pistas que o lembrem do momento do trauma. O TEPT é um transtorno que afeta de 1,3 a 9% da população mundial (MASCI; RANGE, 2001), e geralmente é associado a outros transtornos de ansiedade (GOISMAN et al., 1998). Este transtorno afeta negativamente a vida de pessoas de todas as idades, porém, ainda não possui um tratamento específico ou eficiente. A terapêutica do estresse pós-traumático inclui o tratamento de sinais e sintomas da desordem e de comorbidades. Nos Estados Unidos, os únicos tratamentos farmacológicos aprovados para o TEPT atualmente incluem apenas a Paroxetina e Setralina, ambos antidepressivos com ação de inibição da receptação de serotonina (Wynn, 2015).

Modelos animais são ferramentas úteis para estudar os mecanismos moleculares e a fisiologia de transtornos psiquiátricos, além de auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos, abrangendo, assim, os casos de pacientes não-responsivos ao tratamento oferecido atualmente. No caso do TEPT, existem alguns modelos animais que já foram propostos, sendo que o condicionamento de medo Pavloviano fornece

um dos melhores modelos em roedores de desordens de ansiedade, incluindo o TEPT (CAI et al., 2006). A maioria dos estudos sobre TEPT que foram realizados até o momento focam em modular a resposta de medo instalada no momento do condicionamento, porém, na clínica, isso seria inviável. Para isso, são necessários estudos que procurem métodos de diminuir a resposta de medo frente a uma memória aversiva após a consolidação desta memória.

1.2 CONDICIONAMENTO AVERSIVO E TEPT

Em 1927, Ivan Pavlov mostrou a existência do condicionamento clássico por meio da resposta de salivação dos cães em frente à comida (PAVLOV, 1927). O condicionamento clássico, ou pavloviano consiste em parear um estímulo incondicionado, que causa uma resposta fisiológica incondicionada (e.g.: salivação em frente à comida) a um estímulo incondicionado (que não causa uma resposta fisiológica). O exemplo clássico do condicionamento pavloviano é o pareamento do alimento ao som de um sino. Ao apresentar alimento a um animal, a sua resposta fisiológica incondicionada é a salivação. Quando, ao mesmo tempo, o alimento é apresentado juntamente a um som (que, sozinho, não causa resposta de salivação), o animal associa os dois estímulos e o estímulo neutro passa a ser condicionado. Assim, o animal começa a apresentar uma resposta fisiológica condicionada ao estímulo condicionado: no exemplo, o animal passa a salivar ao escutar o som que foi pareado ao alimento.

Para instalar o medo condicionado, o procedimento é similar. Um estímulo condicionado, por exemplo, um contexto ou odor, é pareado com um estímulo incondicionado, um choque, por exemplo. Com isso, o animal passa a associar o estímulo condicionado com o estímulo aversivo e apresenta resposta de medo frente a ele.

Quando o animal é novamente exposto ao estímulo condicionado, exhibe respostas de medo condicionado, como o congelamento (PAMPLONA et al., 2006), comportamento que consiste em uma postura com ausência total de movimentos aparentes, exceto aqueles responsáveis pela respiração (LANDEIRA-FERNANDEZ; CRUZ; BRANDÃO, 2006). Há estudos que indicam

que a memória de medo contextual formada em ratos durante um choque de alta intensidade pode ser qualitativamente e quantitativamente semelhante à memória traumática em TEPT (ABRARI et al., 2008).

Outro modelo de estudo de TEPT consiste em expor repetidamente o animal a lembretes situacionais do evento traumático, neste caso um choque nas patas (PYNOOS et al., 1996). Estes lembretes situacionais visavam replicar a situação que ocorre em humanos, na qual o paciente é frequentemente confrontado com lembranças do trauma, mas não ao evento traumático. O modelo mais extremo já proposto consiste em expor o animal a um estresse prolongado único. Este estresse consiste de duas horas de imobilização, seguido por 20 minutos de natação e anestesia por éter como descrito (LIBERZON; KRSTOV; YOUNG, 1997), embora seja pouco utilizado devido a questões éticas.

1.3 EXTINÇÃO DA MEMÓRIA, RECUPERAÇÃO ESPONTÂNEA, REINSTALAÇÃO E RENOVAÇÃO

A reexposição ao contexto por períodos prolongados sem a presença do estímulo incondicionado (e.g., choque) leva à extinção da memória aversiva. O processo de extinção da memória não leva ao enfraquecimento da memória aversiva, mas sim um novo aprendizado, associando o contexto com a ausência do estímulo aversivo, diminuindo a resposta de medo ao contexto. Este novo aprendizado é lento e suscetível a perturbações (GOODE; MAREN, 2014). Visto que a memória original permanece inalterada, há três fenômenos que a memória pode sofrer, que são chamados de recuperação espontânea, reinstalação e renovação. O termo renovação da memória extinta consiste no retorno da resposta condicionada extinta após o estímulo condicionado ser reapresentado fora do contexto da extinção. A reinstalação da memória extinta acontece quando há o retorno da resposta condicionada extinta quando apenas o estímulo incondicionado é reapresentado (FURINI; MYSKIW; ISQUIERDO, 2014; BOUTON, 2014). A recuperação espontânea da memória consiste no retorno do comportamento de medo após sua extinção, sem um novo condicionamento, apenas pela passagem do tempo.

Alguns estudos mostram que alguns fatores podem facilitar a recuperação espontânea da memória aversiva ao estímulo condicionado, como a reexposição ao estímulo incondicionado (RESCORLA; HETH, 1975), a exposição do animal a um estresse antes da consolidação da memória de medo (FARRELL et al., 2010) e o aumento tempo entre a extinção e o teste (MEYERS et al., 2006). Há algumas estratégias para prevenir a recuperação espontânea da memória aversiva. Entre elas estão o número e duração da reexposição do animal ao contexto sem o estímulo aversivo, apenas pela passagem do tempo (RESCORLA, 2004), extinção do estímulo condicionado em diversos ambientes (CHELONIS et al., 1999), entre outros (BOSCHEN; NEUMANN; WATERS, 2009). Novas maneiras de prevenir a recuperação espontânea da memória aversiva, otimizando, assim, o tratamento dos pacientes que sofrem com TEPT ainda precisam ser estudadas.

Mais recentemente tem sido proposto o fenômeno de bloqueio da reconsolidação da memória para alterar uma memória existente. Quando uma memória é reativada pela breve reexposição do animal ao contexto, a memória entra em uma nova fase de consolidação, voltando a ser lábil por um período de tempo. Neste período de labilidade, a memória pode ser modulada pelo tratamento farmacológico (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2006; STERN et al., 2012). Intervenções farmacológicas nestes momentos logo após a reconsolidação podem alterar a memória original, levando ao seu apagamento. Essa intervenção pode ser utilizada no tratamento do TEPT.

1.4 MEMÓRIA AVERSIVA E ESTRESSE

Diversos estudos mostram que o estresse pode interagir com a aquisição da memória condicionada ao medo (FARRELL et al., 2010; RAIIO; PHELPS, 2015). Por exemplo, a exposição a um estresse de imobilização logo após a sessão de condicionamento levou à redução do tempo de congelamento no dia seguinte (UWAYA et al., 2016). Em outro estudo foi mostrado que o estresse de manipulação dos animais após o condicionamento facilitou o condicionamento aversivo a um estímulo auditivo neutro (HUI et al., 2006). O estresse também pode facilitar a aquisição da memória de medo

quando é aplicado antes da consolidação da memória aversiva (RAU; FANSELOW, 2009). A exposição ao estresse antes da consolidação da memória de medo foi sugerida como um modelo de TEPT em animais – o estresse sensibiliza os animais e os torna mais suscetíveis a adquirir o condicionamento aversivo (RAU; DECOLA; FANSELOW, 2005).

O estresse prejudica também a extinção da memória (AKIRAV; MAROUN, 2007) e facilita a recuperação espontânea da memória extinta (MIRACLE et al., 2006; WILBER et al., 2011). A exposição a um estresse prolongado após a consolidação de uma memória aversiva prejudica a aprendizagem de sua extinção (KNOX et al., 2012). Na maioria dos estudos feitos nesta área, o estresse é aplicado antes ou logo após o condicionamento dos animais, o que dificulta a aplicação na clínica.

Em 2013, Deschaux e colaboradores realizaram um estudo para verificar o efeito de um estressor não associado ao contexto à resposta de medo extinta (DESCHAUX et al., 2013). O grupo concluiu que houve aumento do tempo de congelamento nos os animais que passaram pelo estresse da plataforma elevada logo antes do teste em comparação com o grupo controle.

Neste trabalho, procuramos estudar o efeito de diferentes estressores (associados, não associados ou relacionados ao contexto) na memória aversiva extinta. O estresse foi aplicado em diferentes momentos do protocolo, a fim de entender em qual parte da formação da memória o estresse pode interferir. Os animais foram estressados 1 hora após a extinção, o que pode interferir com a consolidação da extinção, ou 48 horas após a extinção, período em que a consolidação da extinção já foi completada. Em seguida foi avaliado se o estressor teve efeito de induzir a recuperação da memória extinta ou diminuir ainda mais o tempo de congelamento dos animais. Com exceção de um experimento, o estressor não foi aplicado no mesmo dia dos testes para avaliar o comportamento de congelamento, a fim de verificar se o efeito do estressor na memória é persistente. Este trabalho teve como objetivo testar a hipótese que um estressor não associado ao trauma tem o potencial de recuperar a memória aversiva extinta. O entendimento dos mecanismos envolvidos pode auxiliar a compreender os fatores associados com a incidência de recaída em pacientes com Transtorno do Estresse Pós-Traumático.

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito de diferentes estressores na memória aversiva extinta, aplicados após 1 ou 48 horas após a extinção da memória.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do estresse de choque de baixa intensidade na memória aversiva extinta, aplicado após 1 ou 48 horas após a extinção da memória;
- Avaliar o efeito do estresse de contenção leve na memória aversiva extinta, aplicado após 1 ou 48 horas após a extinção da memória;
- Avaliar o efeito do estresse de contenção leve combinado e um odor condicionado aversivamente na memória aversiva extinta, aplicado após 1 ou 48 horas após a extinção da memória;
- Avaliar o efeito do estresse de plataforma elevada na memória aversiva extinta, aplicado após 1 ou 48 horas após a extinção da memória;
- Avaliar o efeito do estresse de imobilização aguda na memória aversiva extinta, aplicado após 1 ou 48 horas após a extinção da memória;
- Avaliar o efeito do estresse de imobilização aguda aplicado na memória aversiva extinta momentos antes do teste de tempo de congelamento

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados foram ratos Wistar machos com 90 dias de idade, provenientes do biotério do setor de Ciências Biológicas da UFPR, mantidos em caixas plásticas (60 x 25 x 25cm), grade padrão, até 5 animais por caixa, sob temperatura controlada ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12:12 (luzes acesas

às 7h e apagadas às 19h) e água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados após aprovação do protocolo experimental pelo Comitê de Ética de Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas, sob CEUA número 1028.

3.2 APARATO

A sessão de condicionamento de medo contextual foi realizada em uma caixa (365 x 290 x 500mm) confeccionada em chapa de aço, sendo as paredes laterais opacas com pintura epóxi, porta superior e frontal em acrílico cristal, divisória interna para a área de escape e bandeja coletora de dejetos. O piso é constituído em barras de aço inoxidável com espaçamento de 10 mm, ligado a um gerador de choque.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais passaram pelas sessões de condicionamento, extinção, e depois foram divididos em 3 grupos: os animais controle, que não passam pelo estressor; os animais que são colocados no estressor 1 hora após a sessão de extinção; os animais que são colocados no estressor 48 horas após a sessão de extinção. São realizados testes para avaliação do tempo de congelamento dos animais no dia após a sessão de extinção e no quinto dia de protocolo, como ilustrado na imagem abaixo.

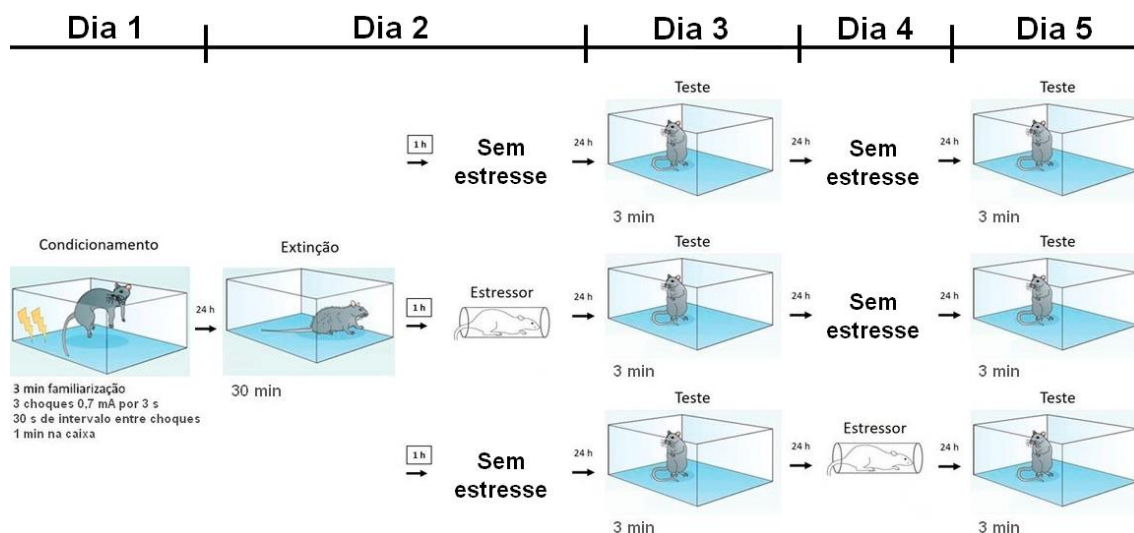


Figura 1. Desenho experimental. No primeiro dia do protocolo, os animais são condicionados aversivamente ao contexto. No dia seguinte, passam pela extinção e um dos grupos é estressado 1h após o protocolo de extinção. Todos os animais são testados quanto ao tempo de congelamento no terceiro dia de experimento. No quarto dia, um dos grupos passa pelo estressor. No último dia do protocolo, os animais são retestados quanto ao tempo de congelamento.

Para o condicionamento ao contexto, os animais foram colocados na caixa de condicionamento durante 3 minutos antes de receberem três choques nas patas de intensidade de 0,7 mA com duração de 3 segundos, com um intervalo de 30 segundos entre cada um dos choques. Sendo assim, os estímulos foram aplicados nos tempos de 3 minutos, 3 minutos e 30 segundos e 4 minutos. Os animais foram mantidos na caixa por mais 1 minuto, totalizando uma permanência de 5 minutos na caixa.

A extinção foi realizada em uma única sessão de 30 minutos de reexposição ao contexto (caixa de condicionamento) sem choque (PAMPLONA; BITENCOURT; TAKAHASHI, 2008), sendo o tempo de congelamento analisado em blocos de 3 minutos. Após extinção, espera-se que os animais apresentem pouco comportamento de congelamento quando reexpostos ao contexto. Para confirmar, os animais são testados no dia seguinte durante 3 minutos, no qual o tempo total de congelamento será avaliado.

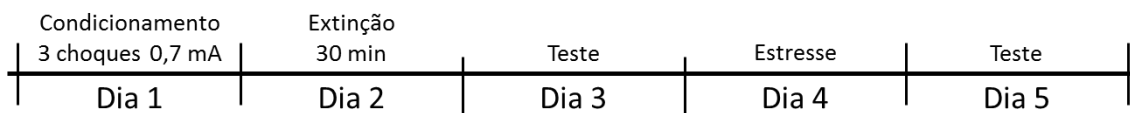


Figura 2. Linha do tempo do grupo experimental em que o estressor é aplicado 48h após a sessão de extinção.

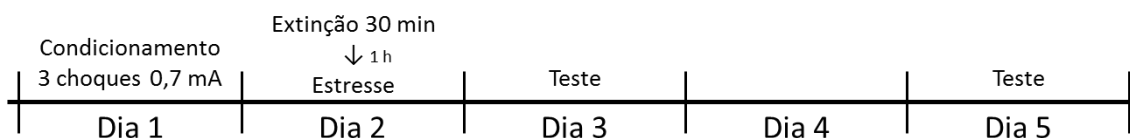


Figura 3. Linha do tempo do grupo experimental em que o estressor é aplicado 1h após a sessão de extinção.

3.4 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CONGELAMENTO

Para avaliar o comportamento de congelamento, que caracteriza a resposta de medo, é avaliado o tempo em que o animal permanece com ausência de movimentos, exceto aqueles relacionados à respiração.

3.5 ESTRESSOR: CHOQUE DE BAIXA INTENSIDADE

Foi aplicado um único choque de 0.2mA durante 3 segundos como estressor da mesma natureza, aplicado no mesmo contexto, para verificar se a similaridade da natureza do estressor é um fator importante para a modulação da memória aversiva instalada e já extinta. N: Controle = 6; Estresse dia 2 = 7; Estresse dia 4 = 7.

3.6 ESTRESSOR SEM CONDICIONAMENTO

Foi realizado um experimento em que nenhum animal foi condicionado ao contexto por meio de choque nas patas, mas foram familiarizados à caixa de

condicionamento por 5 minutos e no dia seguinte passaram por uma reexposição ao contexto durante 30 minutos – o que mimetiza uma extinção de memória aversiva. Depois, os animais foram divididos em três grupos em relação à exposição ao estressor leve (item 2.7): animais que não foram estressados, animais que foram estressados 1 hora após a reexposição ao contexto durante 30 minutos e animais que foram estressados um dia após o primeiro teste, no dia 4 de experimento. Este experimento foi realizado com o fim de avaliar se apenas a exposição ao estressor poderia influenciar na resposta de medo em um contexto neutro, comportamento que é chamado de generalização. Os animais foram testados duas vezes, de acordo com a linha do tempo do experimento. Este experimento tem o objetivo avaliar se apenas um estressor agudo é suficiente para induzir resposta de congelamento, independente do condicionamento, o que invalidaria os resultados deste trabalho. N: Controle = 6; Estresse dia 2 = 5; Estresse dia 4 = 5.

3.7 ESTRESSOR: CONTENÇÃO LEVE

Os grupos que são submetidos ao estressor de contenção leve (não associado ao contexto) são confinados em um constritor durante 15 minutos. Os animais são colocados em um tubo cilíndrico de policloreto de polivinila (PVC) com 8cm de diâmetro, sendo que o comprimento pode ser ajustado de acordo com o comprimento do animal restrito. Após 15 minutos no constritor, o animal é retornado à sua gaiola.

No experimento, todos os animais foram condicionados ao contexto e posteriormente divididos em três grupos, animais que não foram estressados, animais que foram estressados 1 hora após extinção (durante a janela de consolidação da nova memória proveniente da extinção) e animais que foram estressados um dia após o primeiro teste, pós-janela de consolidação da extinção. Este experimento foi realizado com o fim de avaliar se o estressor é capaz de influenciar a resposta de medo em um contexto não associado a ele. O grupo exposto ao estressor durante a janela de consolidação pode ter uma influência maior do estressor, uma vez que a memória aversiva contextualizada

está lábil neste momento. Os animais foram testados duas vezes. N: Controle = 13; Estresse dia 2 = 14; Estresse dia 4 = 13.

3.8 CONDICIONAMENTO AO ODOR

A fim de aumentar a associação do ambiente aversivo do choque com o estressor, testamos um condicionamento múltiplo que envolve a apresentação de um odor no momento do condicionamento do animal. O odor escolhido foi o de banana (acetato de isoamila). Para isso, os animais foram condicionados ao contexto contendo uma gaze com 250 μ L de acetato de isoamila (a 5%, diluído em propanoglicol). Para testar a aversão do animal ao odor condicionado, a gaze contendo o mesmo odor foi colocada no compartimento escuro de uma caixa contendo um compartimento claro (4 lux) e um escuro (0 lux). Os animais foram avaliados quanto à aproximação ao odor no quarto dia do protocolo mostrado na figura 4. N: Condicionados = 10; Não condicionados = 9.

| | | | |
|--|---|--|-------|
| Ambientação caixa de condicionamento (5 min) | Condicionamento 5 choques 0,5 mA + odor | Ambientação caixa de teste (10 min) | Teste |
| Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |

Figura 4. Experimento para verificar a eficácia do condicionamento ao odor.

3.9 ESTRESSOR ASSOCIADO AO ODOR

Os animais foram expostos ao odor durante o condicionamento. No dia seguinte, passaram por uma extinção seletiva, sem a reexposição longa ao odor: a memória extinta deve ser a do contexto espacial, mas não a olfatória. No dia seguinte, avaliamos a resposta de congelamento do animal na caixa de condicionamento. No dia quarto dia de experimento, os animais passam pelo estresse de contensão na presença do odor condicionado ou sem a presença do odor. Depois de 24h, eles foram retestados para avaliar se o estresse

combinado com o odor condicionado teve influência na resposta de medo do animal ao contexto em relação aos animais estressados sem o odor. N: Estresse sem aroma = 10; Estresse com aroma = 10.

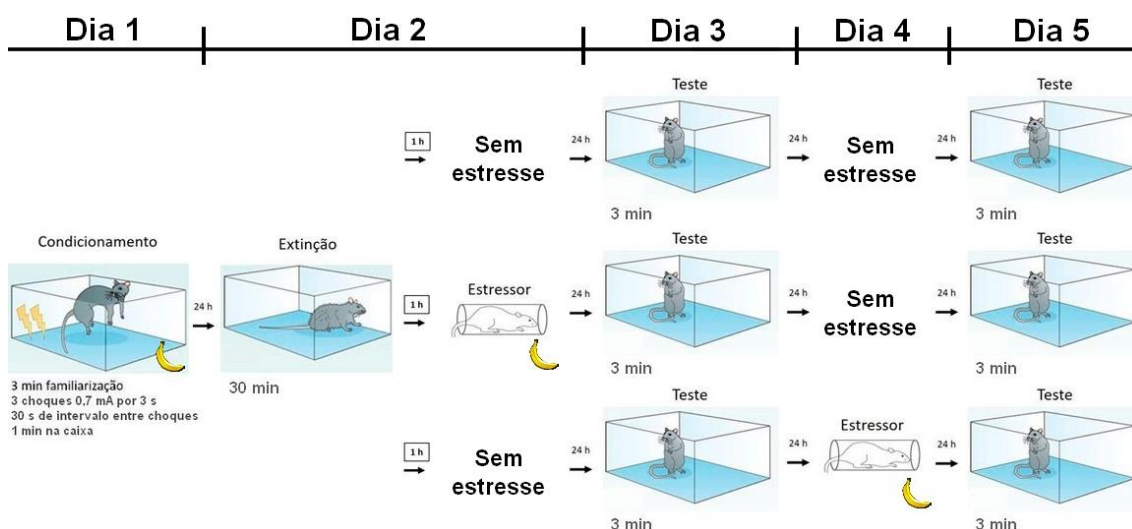


Figura 5. Desenho experimental com aroma de banana.

3.10 ESTRESSOR: IMOBILIZAÇÃO AGUDA

O estresse de imobilização aguda consiste em manter os animais em constritores de plástico ajustáveis ao diâmetro do animal durante 1h. Neste modelo, os animais não tem a possibilidade de movimentação. Neste estressor, as extremidades são abertas para que as vias aéreas e cauda do animal estejam livres (GAMEIRO et al., 2006). N: Controle = 20; Estresse dia 2 = 10; Estresse dia 4 = 10.

3.11 ESTRESSOR: PLATAFORMA ELEVADA

A plataforma elevada consiste em base de 1.5m de altura e plataforma de 20x20cm. As medidas foram baseadas no estudo de Deschaux, que avaliou o efeito deste estressor em uma memória aversiva extinta (DESCHAUX et al.,

2013). Os animais permaneceram na plataforma elevada durante 30 minutos. N: Controle = 6; Estresse dia 2 = 7; Estresse dia 4 = 7.

3.12 ESTRESSOR: IMOBILIZAÇÃO AGUDA APLICADA ANTES DO TESTE

Seguindo o protocolo aplicado no experimento de Deschaux e colaboradores, de 2013 (DESCHAUX et al., 2013), um estressor não associado ao contexto foi aplicado logo antes do animal ser testado no contexto. Para controle do nosso experimento, os animais foram expostos ao estresse de imobilização aguda, seguindo a linha do tempo abaixo. N: Sem estresse = 10; Com estresse = 10.

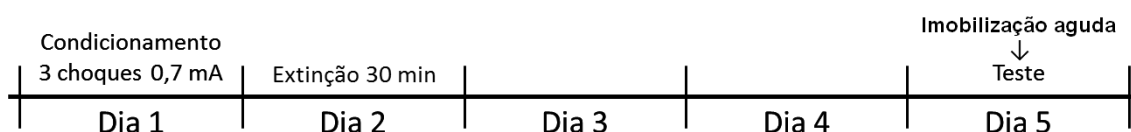


Figura 6. Experimento para verificar o efeito do estresse de imobilização aguda aplicada logo antes do teste

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas ou teste-T de Student, de acordo com a quantidade de variáveis avaliadas. Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos. Os dados foram representados como média \pm EPM (erro padrão da média).

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO CHOQUE DE BAIXA INTENSIDADE APÓS CONDICIONAMENTO E EXTINÇÃO

O choque de leve intensidade levou a uma diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($F(2, 17)=10,793$, $p=,00094$), porém, não houve diferença entre o tempo de congelamento entre os testes 1 e teste 2 ($F(1, 17)=,59727$, $p=,45024$). Na interação entre grupo e teste, houve diferença significativa ($F(2, 17)=3,6015$, $p=,04965$). O choque, tanto 1h após a sessão de extinção, como após a consolidação da extinção, foi capaz de reinstalar a memória aversiva ($p<0,05$).

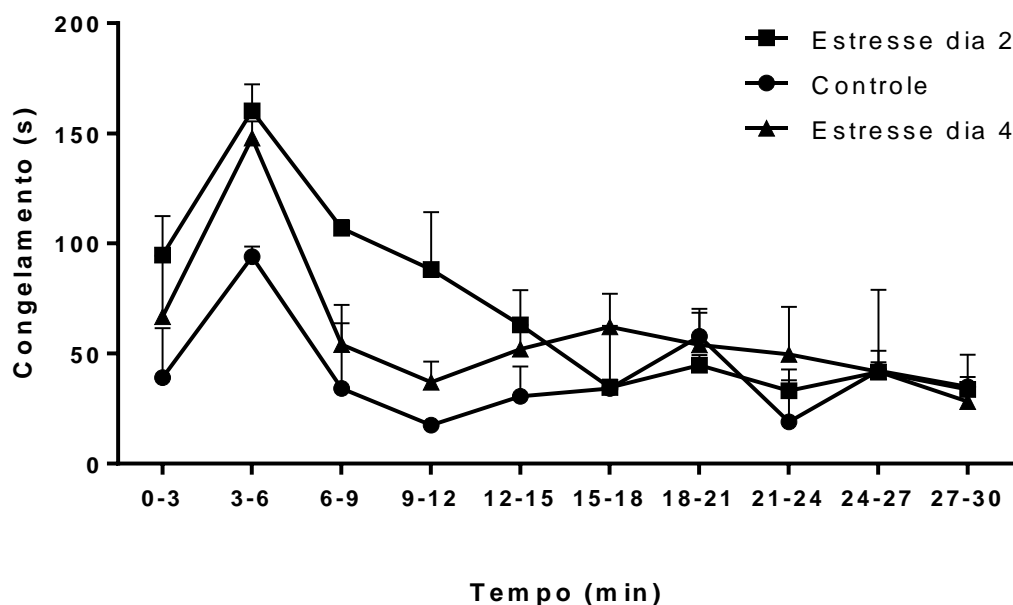


Figura 7. Decaimento do tempo de congelamento durante a extinção. Média + EPM.

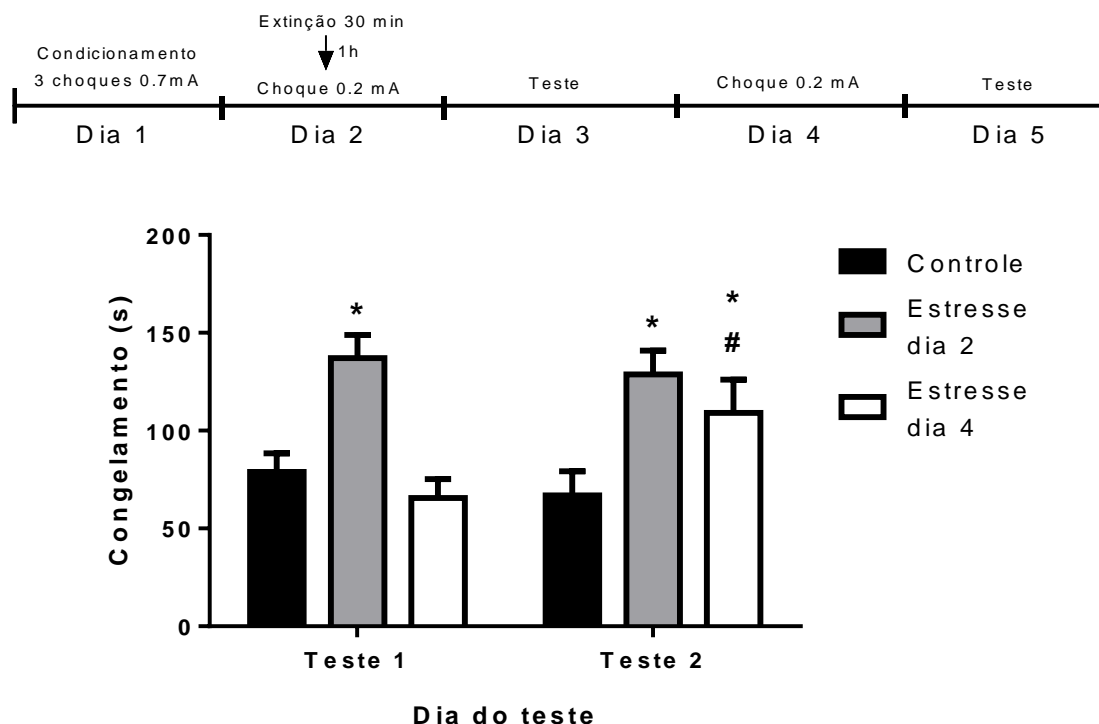


Figura 8. Gráfico do experimento que analisa o efeito do choque de baixa intensidade após o animal ter sido condicionado ao contexto e ter passado pela extinção desta memória. * $p < 0,05$ em relação ao controle no mesmo teste. # $p < 0,05$ em relação ao teste 1 do mesmo grupo. ANOVA, média + EPM.

4.2 ESTRESSOR SEM CONDICIONAMENTO

O tempo de congelamento foi sempre próximo de zero, exceto para um animal, o que indica que não há influência apenas do estressor sobre a resposta de medo em um contexto neutro.

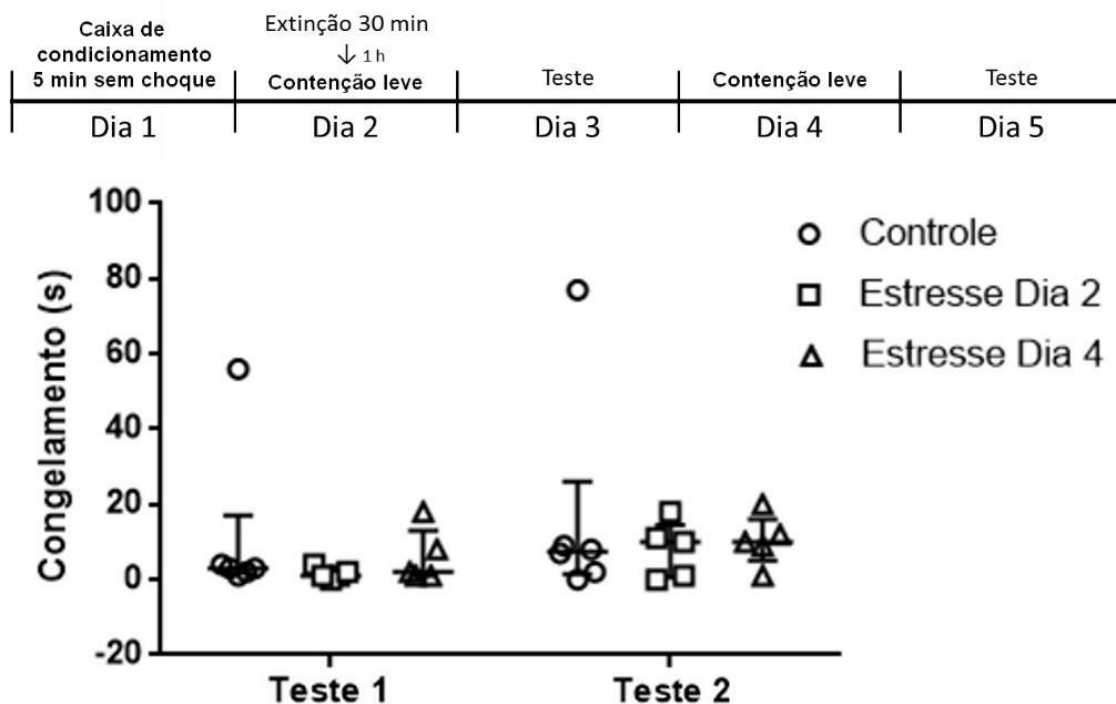


Figura 9. Gráfico que analisa o efeito do estressor em animais que não passaram pelo condicionamento (choque nas patas). Valores individuais e média \pm EPM.

4.3 EFEITO DO CONTENSOR APÓS CONDICIONAMENTO E EXTINÇÃO

O estresse aplicado 1h após a sessão de extinção não afetou o tempo de congelamento no teste 1 (teste t, $t=1,14$, $p=0,28$). Similarmente, o estresse aplicado 2 dias após a sessão de extinção não levou à reinstalação da memória aversiva no teste 2 (teste t, $t=-0,32$, $p=0,75$).

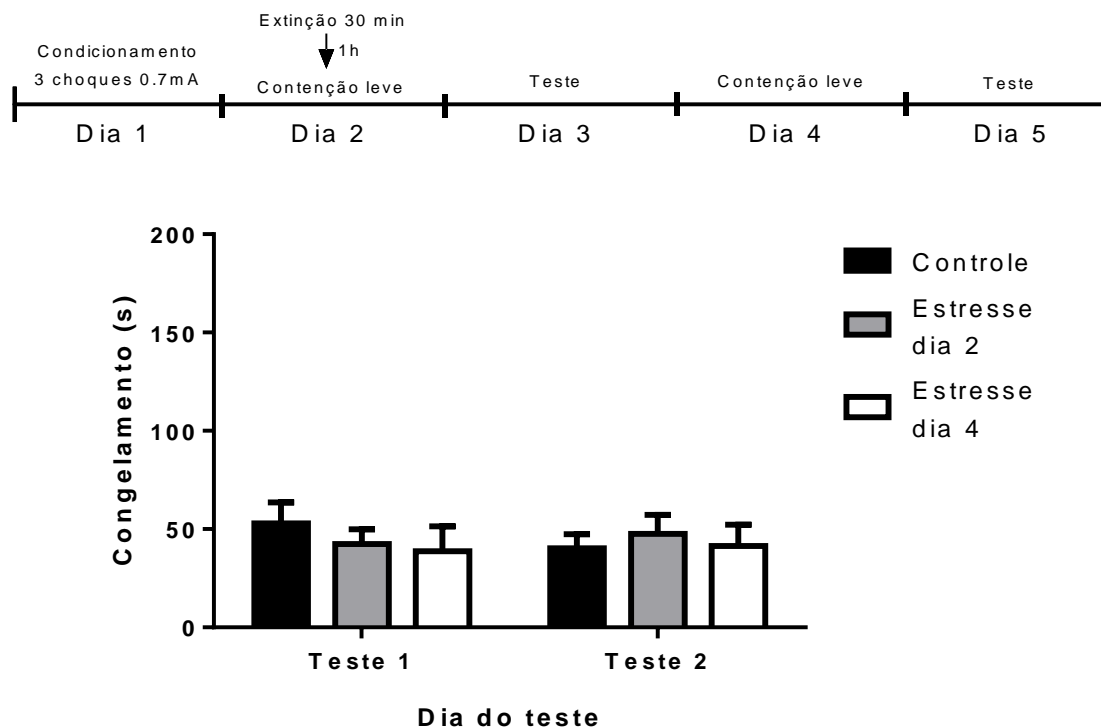


Figura 10. Gráfico do experimento que analisa o efeito do estresse sobre a consolidação do processo de extinção. O estresse foi realizado 1h ou 48h após a sessão de extinção. Teste t, média + EPM.

4.4 CONDICIONAMENTO AO ODOR

Os animais expostos ao odor durante o condicionamento (choque) evitaram o compartimento escuro da caixa, no qual a gaze contendo o odor estava localizada (teste t, $t=2,568$, $p=0,02$).

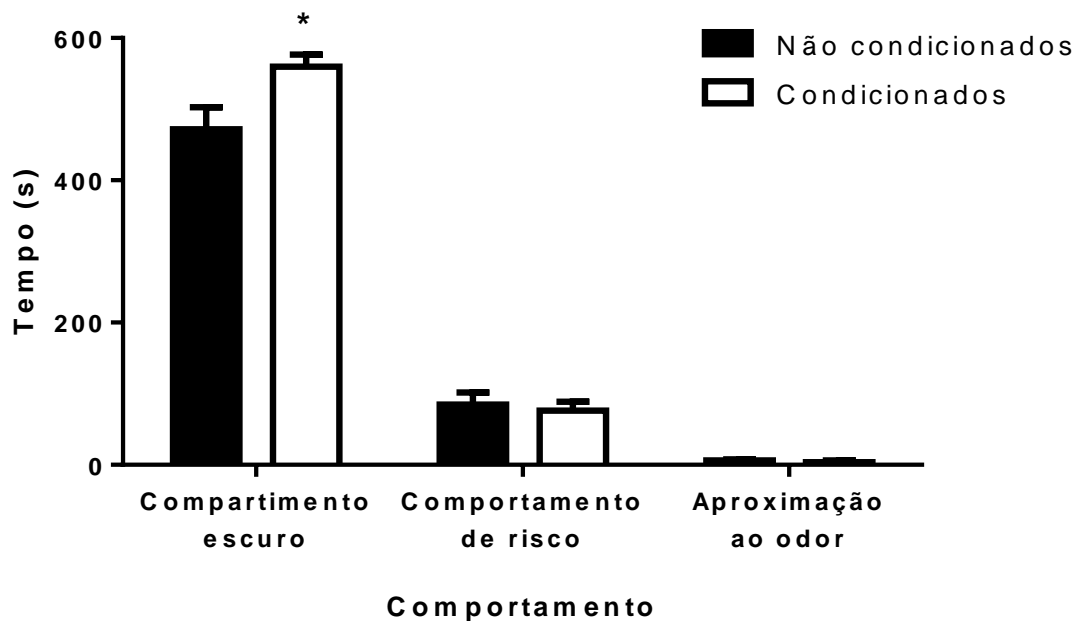


Figura 11. Gráfico do experimento que analisa a eficácia do condicionamento ao odor. Teste t, média + EPM.

4.5 EFEITO DO ESTRESSOR COMBINADO AO AROMA CONDICIONADO

O estresse de contenção leve associado ao aroma condicionado não levou a uma diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($F(1, 36)=,02666$, $p=,8712$) e no tempo de congelamento entre os testes 1 e teste 2 ($F(1, 36)=1,261$, $p=,2689$). Na interação entre grupo e teste, também não houve diferença significativa ($F(1, 36)=,1092$, $p=,7430$). O estresse de imobilização aguda, tanto 1h após a sessão de extinção, como após a consolidação da extinção, não foi capaz de reinstalar a memória aversiva.

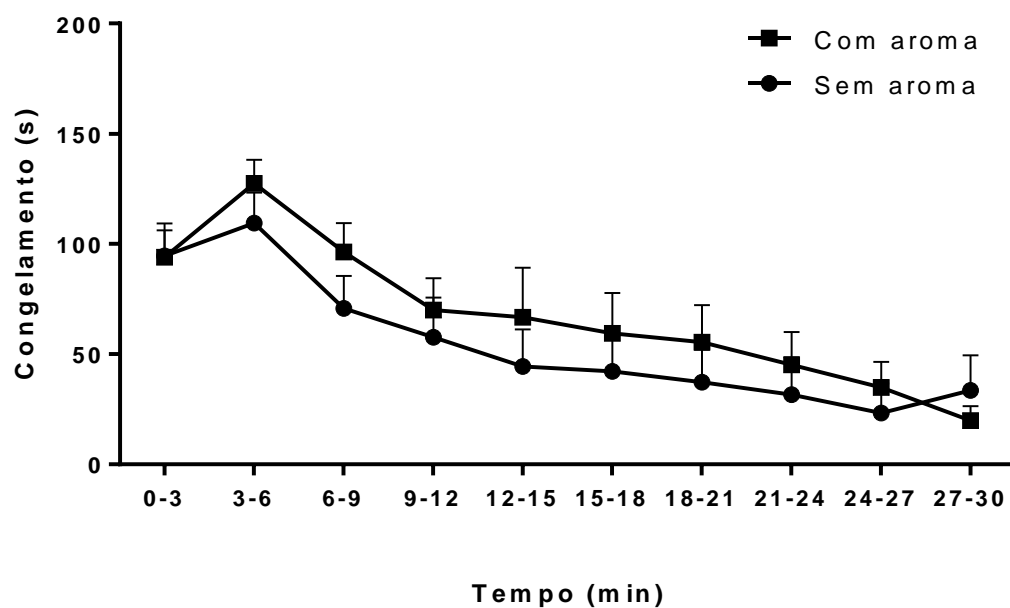


Figura 12. Decaimento do tempo de congelamento durante a extinção. Média + EPM.

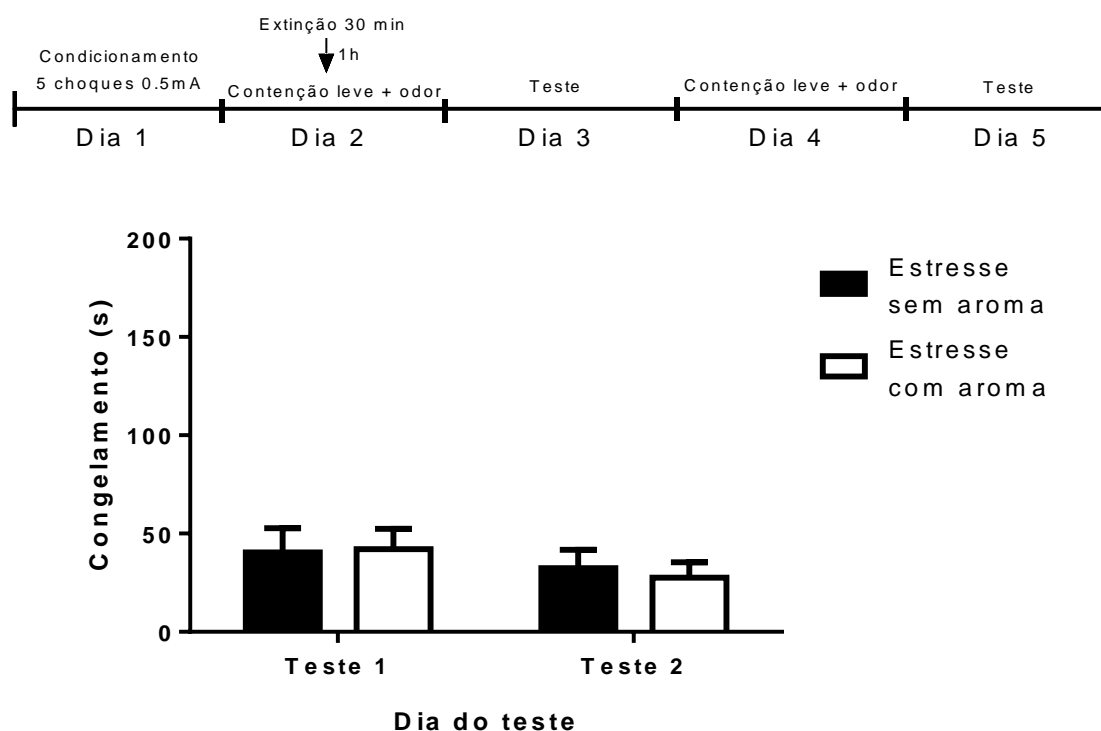


Figura 13. Gráfico do experimento que analisa o efeito do estressor combinado com o aroma comparado e não combinado com o aroma após o animal ter sido condicionado ao contexto e ter passado pela extinção desta memória. ANOVA, média + EPM.

4.6 EFEITO DA IMOBILIZAÇÃO AGUDA APÓS CONDICIONAMENTO E EXTINÇÃO

O estresse de imobilização aguda não levou a uma diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($F(2, 74)=1,437$, $p=,2441$), e no tempo de congelamento entre os testes 1 e teste 2 ($F(1, 74)=,5087$, $p=,478$). Na interação entre grupo e teste, também não houve diferença significativa ($F(2, 74)=,0733$, $p=,9294$). O estresse de imobilização aguda, tanto 1h após a sessão de extinção, como após a consolidação da extinção, não foi capaz de reinstalar a memória aversiva.

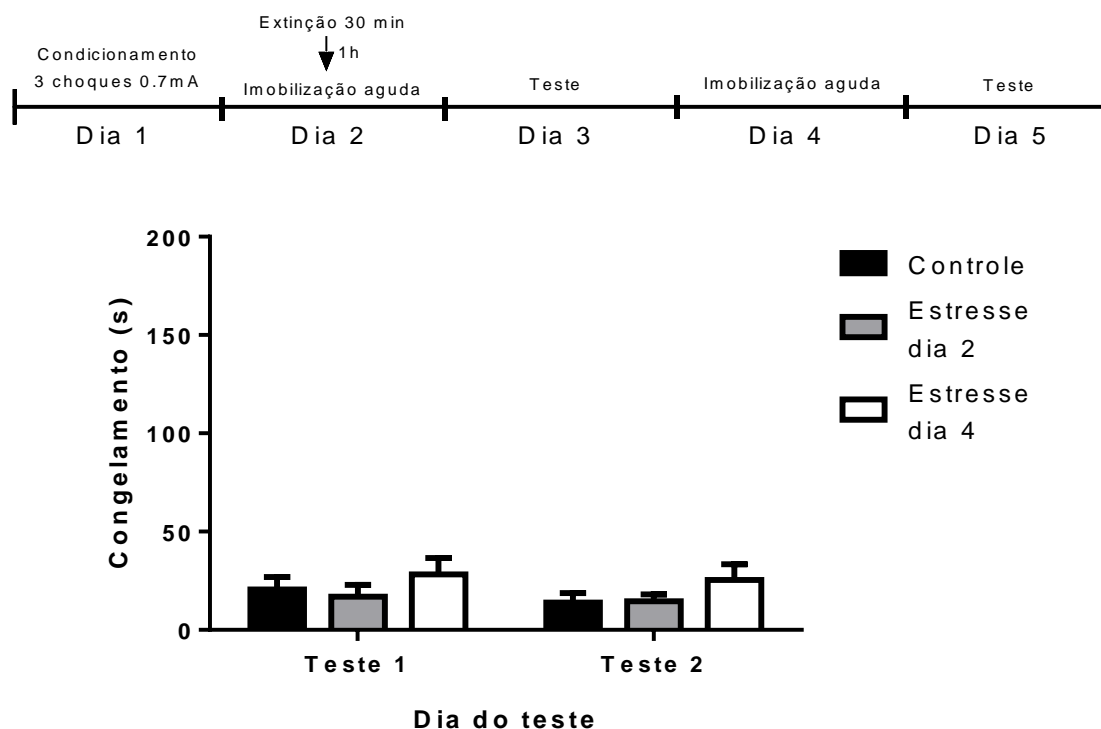


Figura 14. Gráfico do experimento que analisa o efeito do estressor de imobilização aguda após o animal ter sido condicionado ao contexto e ter passado pela extinção desta memória. ANOVA, média + EPM.

4.7 EFEITO DA PLATAFORMA ELEVADA APÓS CONDICIONAMENTO E EXTINÇÃO

O estresse de plataforma elevada não levou a uma diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($F(2, 17)=,8109$, $p=,4609$), e no tempo de congelamento entre os testes 1 e teste 2 ($F(1, 17)=,0114$, $p=,9163$). Na interação entre grupo e teste, também não houve diferença significativa ($F(2, 17)=1,5935$, $p= 0,2321$). O estresse da plataforma elevada, tanto 1h após a sessão de extinção, como após a consolidação da extinção, não foi capaz de reinstalar a memória aversiva.

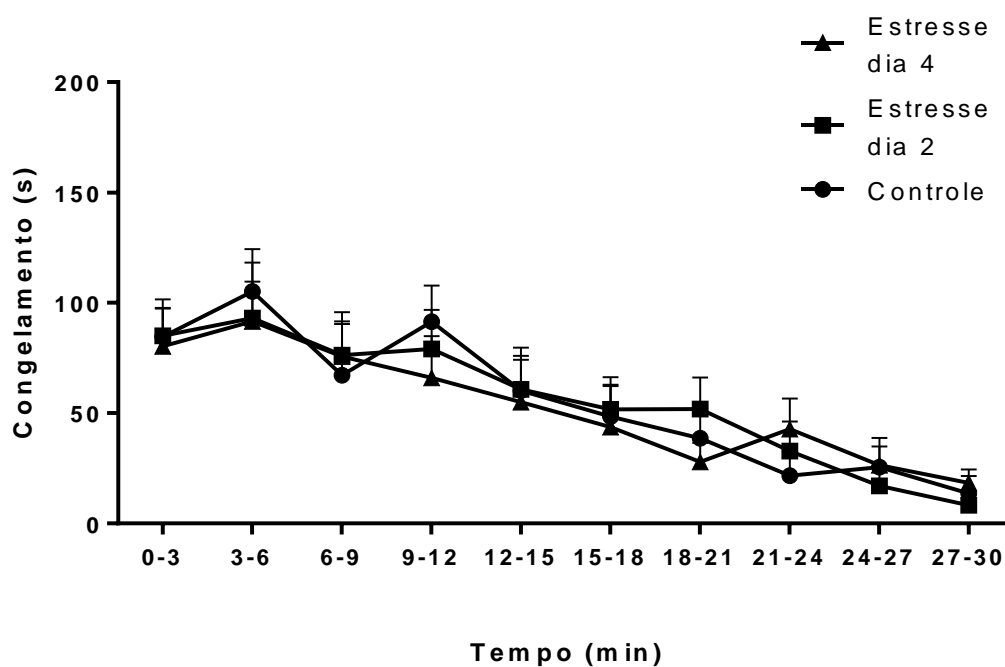


Figura 15. Decaimento do tempo de congelamento durante a extinção. Média + EPM.

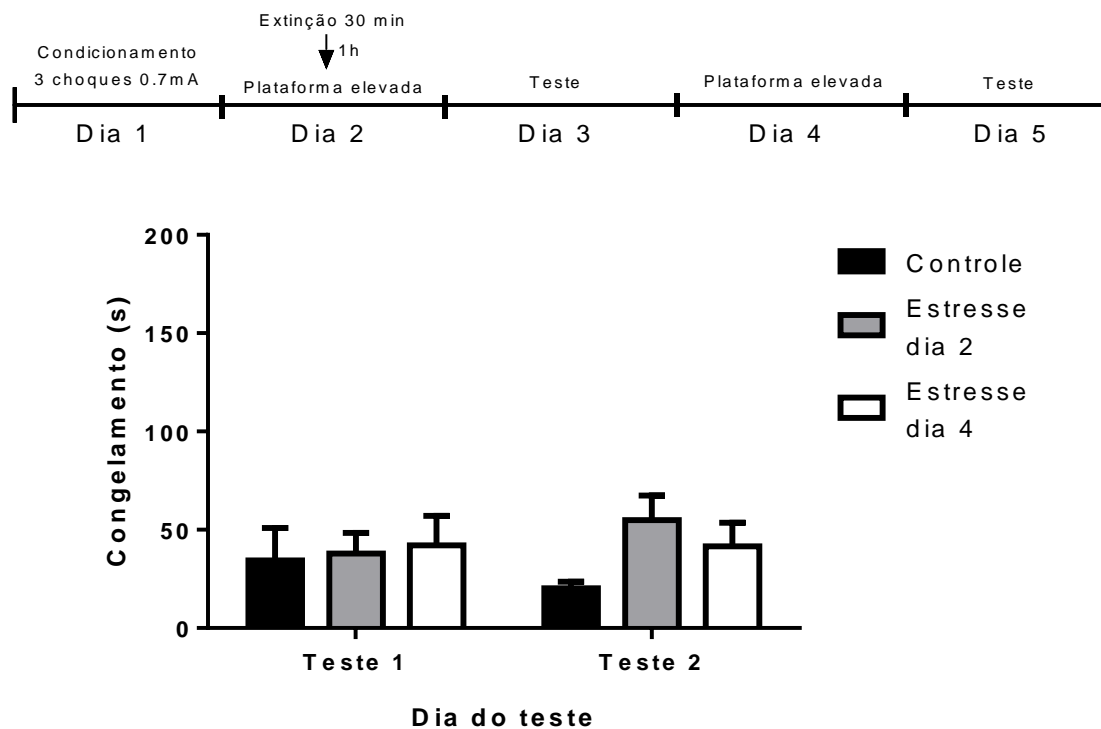


Figura 16. Gráfico do experimento que analisa o efeito do estressor da plataforma elevada após o animal ter sido condicionado ao contexto e ter passado pela extinção desta memória. ANOVA, média + EPM.

4.8 EFEITO DA IMOBILIZAÇÃO AGUDA APLICADA ANTES DO TESTE

O grupo que foi exposto ao estresse de imobilização aguda logo antes do teste não apresentou diferença estatística no tempo de congelamento no contexto quando comparado com o grupo não exposto ao estressor (teste t, $t=1,17$, $p=0,25$).

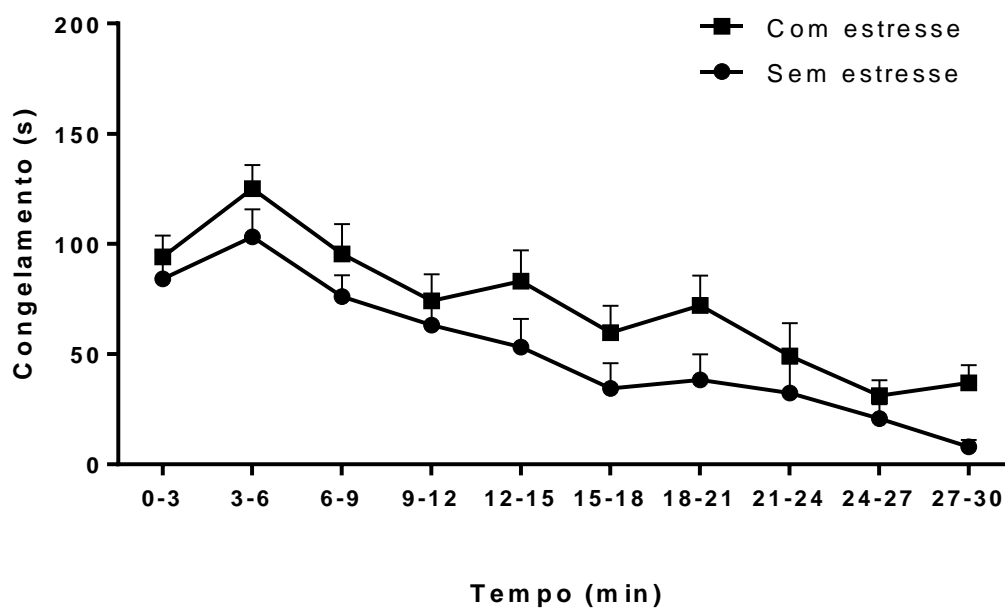


Figura 17. Decaimento do tempo de congelamento durante a extinção. Média + EPM.

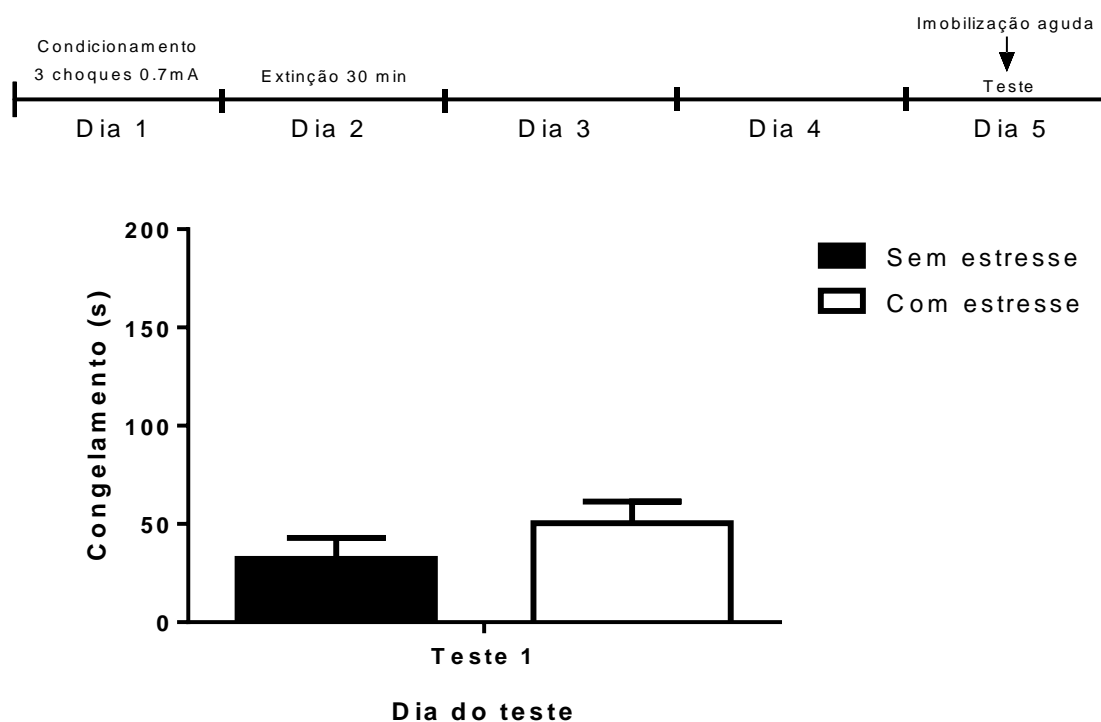


Figura 18. Gráfico do experimento que analisa o efeito da imobilização aguda aplicada logo antes do teste após o animal ter sido condicionado ao contexto e ter passado pela extinção desta memória. Teste t, média + EPM.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que estressores não associados ao contexto aplicados 1 hora ou 48 horas após a extinção da memória aversiva, não são capazes de modular o comportamento de medo em frente ao contexto. Indica-se também que estressores da mesma natureza do estímulo incondicionado possuem a capacidade de reinstalar resposta de medo do animal ao contexto. Além disso, o estresse de contenção leve não foi capaz de gerar generalização da resposta de medo.

Neste estudo, o estressor não associado ao contexto aplicado logo antes do teste não causou aumento no tempo de congelamento do animal, diferente do que foi demonstrado por Deschaux em seu experimento (DESCHAUX et al., 2013). Porém, o estressor utilizado neste experimento foi o de imobilização aguda, e os animais apresentavam elevado comportamento de grooming (limpeza) após saírem deste estressor, o que pode ter levado à diminuição do tempo de congelamento por este fator. Comparando com os resultados deste experimento, parece que o momento em que o estressor é aplicado influencia na memória de medo ou no comportamento de medo do animal no contexto, visto que o estressor pode ter uma influência passageira.

O estressor da mesma natureza foi capaz de reinstalar uma memória aversiva extinta. Esse fenômeno já é bem descrito. Por exemplo, uma memória auditiva condicionada aversivamente foi reinstaurada depois de um novo subcondicionamento com intensidade de 0.1mA (DESCHAUX et al., 2011).

Os hormônios relacionados ao estresse parecem estar envolvidos nos processos de memória. Em condicionamentos em que o estímulo aversivo é mais forte, há maior liberação de epinefrina periférica quando comparado a um condicionamento mais brando, e a consolidação também é facilitada (MCCARTY; GOLD, 1981). Há evidências de que o processo de extinção alterado pela liberação periférica de epinefrina é dose-dependente e também depende do momento em que é aplicada. (FURINI; MYSKIW; ISQUIERDO, 2014; ROSA et al., 2013). Outros hormônios também parecem estar envolvidos neste processo: quando há liberação de glicocorticoides, o processo de extinção parece ser facilitado (CAI et al., 2006), enquanto o bloqueio da

atividade dos glicocorticoides prejudica a consolidação da extinção (YANG et al., 2006).

O estresse tem a capacidade de reinstalar um comportamento reforçado por drogas de abuso após extinção deste condicionamento, mesmo após longos períodos (SHALEV et al., 2002). A exposição aguda a choques nas patas (SHAHAM; STEWART, 1995) e privação de comida por 1 dia (SHALEV et al., 2000) são capazes de reinstalar o comportamento de busca por heroína. O estresse de choque nas patas também é capaz de reinstalar o comportamento de busca por cocaína (KUPFERSCHMIDT; BROWN; ERB, 2011). Esses estudos mostram que o estresse tem a capacidade de reinstalar um comportamento extinto.

Os efeitos do estresse na memória de medo são diversos, podendo atuar como facilitadores ou inibidores (BARATTA et al., 2007; KIM; DIAMOND, 2002). O tipo de estressor aplicado possui influência na resposta causada por ele sob a memória de medo – o estresse crônico variável levou à facilitação do condicionamento de medo ao contexto, o que não aconteceu com o protocolo de estresse crônico de contenção (SANDERS; STEVENS; BOEH, 2010). Em outro trabalho, realizado com humanos, foi mostrado que um estressor inescapável fez com que a extinção da memória fosse menos eficaz, enquanto um estressor escapável preveniu a recuperação espontânea da memória (HARTLEY et al., 2014). Com base nesses estudos, é visto que a influência de um estressor na memória de medo varia em diversos aspectos – o efeito em cada situação pode ser diferenciado pela natureza do estressor, sexo, espécie, tempo de aplicação do estresse, entre outros fatores.

Sendo a extinção uma das abordagens clínicas comuns do tratamento de transtornos como o TEPT, e a extinção sendo um processo frágil, com a possibilidade de reemergência da memória que pode ser influenciada por diversos fatores, estudos em animais para a busca de novos tratamentos ou a busca por uma extinção da memória com menor índice de recuperação espontânea se torna necessário, com diferentes estressores, de diferentes naturezas e intensidades, aplicados em diferentes momentos da consolidação da memória de extinção. Como conclusão, o presente estudo sugere que estressores agudos não apresentam o potencial de induzir recuperação de memória previamente extinta.

REFERÊNCIAS

- ABRARI, K. et al. Administration of corticosterone after memory reactivation disrupts subsequent retrieval of a contextual conditioned fear memory: dependence upon training intensity. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 2, p. 178–84, fev. 2008.
- AKIRAV, I.; MAROUN, M. The Role of the Medial Prefrontal Cortex-Amygdala Circuit in Stress Effects on the Extinction of Fear. **Neural Plasticity**, v. 2007, jan. 2007.
- APA (ED.). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition: DSM-5. 5th. ed. [s.l.] **American Psychiatric Publishing**, 2013.
- BARATTA, M. V.; CHRISTIANSON, J. P.; GOMEZ, D. M.; ZARZA, C. M.; AMAT, J.; MASINI, C. V.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Controllable versus uncontrollable stressors bi-directionally modulate conditioned but not innate fear. **Neuroscience**, v. 146, n. 4, p. 1495–503, jun. 2007.
- BOSCHEN, M. J.; NEUMANN, D. L.; WATERS, A. M. Relapse of successfully treated anxiety and fear: theoretical issues and recommendations for clinical practice. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 43, n. 2, p. 89-100, fev. 2009.
- CAI, W.-H. et al. Postreactivation glucocorticoids impair recall of established fear memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 37, p. 9560–6, 13 set. 2006.
- CHELONIS, J. J.; CALTON J. L.; HART, J. A.; SCHACHTMAN, T. R. Attenuation of the renewal effect by extinction in multiple contexts. **Learning and Motivation**, v. 30, n. 1, p.1-14, fev. 1999.
- DESCHAUX, O.; SPENNATO, G.; MOREAU, J. L.; GARCIA, R. Chronic treatment with fluoxetine prevents the return of extinguished auditory-cued conditioned fear. **Psychopharmacology**, v. 215, n. 2, p. 231-7, dez. 2011.
- DESCHAUX, O.; ZHENG, X.; LAVIGNE, J.; NACHON, O.; CLEREN, C.; MOREAU, J-L.; GARCIA, R. Post-extinction fluoxetine treatment prevents stress-induced reemergence of extinguished fear. **Psychopharmacology**, v. 225, p. 209-16, 2013.
- FARRELL, M. R.; SAYED, J. A.; UNDERWOOD, A. R.; WELLMAN C. L. Lesion of infralimbic cortex occludes stress effects on retrieval of extinction but not fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 2, p. 240–6, set. 2010.
- FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C.; IZQUIERDO, I. The learning of fear extinction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 670-83, out. 2014.

GAMEIRO, G. H.; GAMIERO, P. H.; ANDRADE, A. S.; PEREIRA, L. F.; ARTHURI, M. T.; MARCONDES, F. K.; VEIGA, M. C. F. A. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. **Physiology & Behavior**, v. 87, p. 643-49, 2006.

GOISMAN, R. M.; ALLSWORTH, J.; ROGERS, M. P.; WARSHAW, M. G.; GOLDENGERG, I.; VASILE, R. G.; RODRIGEZ-VIAA, F.; MALLYA, G.; KELLER, M. B. Simple phobia as a comorbid anxiety disorder. **Depression and Anxiety**, v. 7, p. 105–12, 1998.

GOODE, T. D.; MAREN, S. Animal Models of Fear Relapse. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 246-58, 2014.

HARTLEY, C. A.; GORUN, A.; REDDAN, M. C.; RAMIREZ, F.; PHELPS, E. A. Stressor controllability modulates fear extinction in humans. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 113, p. 149-56, set. 2014.

HUI, I. R.; HUI, G. K.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L.; WEINBERGER, N. M. Posttraining handling facilitates memory for auditory-cue fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, p. 160-3, fev. 2006.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, p. 453-62, jun. 2002.

KNOX, D.; GEORGE, S. A.; FITZPATRICK, C. J.; RABINAK, C. A.; MAREN, S.; LIBERZON, I. Single prolonged stress disrupts retention of extinguished fear in rats. **Learning & Memory**, v. 19, p. 43-9, fev. 2012.

KUPFERSCHMIDT, D. A.; BROWN, Z. J.; ERB, S. A Procedure for Studying the Footshock-Induced Reinstatement of Cocaine Seeking in Laboratory Rats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 47, jan. 2011.

LIBERZON, I.; KRSTOV, M.; YOUNG, E. A. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. **Psychoneuroendocrinology**, v. 22, n. 6, p. 443–53, ago. 1997.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A. P de M.; BRANDÃO, M. L. Padrões de respostas defensivas de congelamento associados a diferentes transtornos de ansiedade. **Psicologia USP** [online], v.17, n.4, p.175-192, 2006.

MASCI, C.; RANGE, B. Transtorno de Estresse Pós-Traumático. **Psicoterapias Cognitivo-Comportamentais: um diálogo com a psiquiatria**, Porto Alegre: ArtMed Editora. 2001

MCCARTY, R.; GOLD, P. E. Plasma catecholamines: effects of footshock level and hormonal modulators of memory storage. **Hormones and Behavior**, v. 15, n. 2, p.168-82, jun. 1981.

MEYERS, R. A.; ZAVALA, A. R.; SPEER, C. M.; NEISEWANDER, J. L. Dorsal hippocampus inhibition disrupts acquisition and expression, but not

consolidation, of cocaine conditioned place preference. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 2, p. 401-12, abr. 2006.

MIRACLE A. D.; BRACE M. F.; HUYNH K. D.; SINGLER S. A.; WELLMAN C. L. Chronic stress impairs recall of extinction of conditioned fear. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, n. 3, p. 213–8, dez. 2006.

PAMPLONA, F. A. et al. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. **Psychopharmacology**, v. 188, n. 4, p. 641–9, nov. 2006.

PAMPLONA, F. A.; BITENCOURT, R. M.; TAKAHASHI, R. N. Short- and long-term effects of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 1, p. 290–3, jul. 2008.

PAVLOV, I. P. Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. **Oxford University Press**, 1927.

PYNOOS, R. S. et al. A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. **Biological psychiatry**, v. 39, n. 2, p. 129–34, 15 jan. 1996.

RAIO, C. M.; PHELPS, E. A. The influence of acute stress on the regulation of conditioned fear. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 134-46, 2015.

RAU, V.; DECOLA, J. P.; FANSELOW, M. S. Stress-induced enhancement of fear learning: An animal model of posttraumatic stress disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1207–1223, ago. 2005.

RAU, V.; FANSELOW, M. S. Exposure to a stressor produces a long lasting enhancement of fear learning in rats. **Stress**, v. 18, n. 1, 2009

RESCORLA, R. A. Spontaneous recovery. **Learning & Memory**, v. 11, n. 5, p. 501–509, set-out 2004.

RESCORLA, R. A.; HETH, C. D. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. **Journal of Experimental Psychology Animal Behavior Processes**, v. 1, n 1, p. 88–96, jan. 1975.

ROSA, J.; MYSKIW, J. C.; FURINI, C. R. G.; SAPIRAS, G. G.; IZQUIERDO, I. Fear extinction can be made state-dependent on peripheral epinephrine: Role of norepinephrine in the nucleus tractus solitarius, v. 113, p. 55-61, set. 2014.

SANDERS, M. J.; STEVENS, S.; BOEH, H. Stress enhancement of fear learning in mice is dependent upon stressor type: Effects of sex and ovarian hormones. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 2, p. 254-62, set. 2010.

SHAHAM, Y.; STEWART, J. Stress reinstates heroin self-administration behavior in drug-free animals: an effect mimicking heroin, not withdrawal. **Psychopharmacology**, v. 119, p. 334–41, jun. 1995.

SHALEV, U.; HIGHFIELD, D.; YAP, J.; SHAHAM, Y. Stress and relapse to drug seeking in rats: studies on the generality of the effect. **Psychopharmacology**, v. 150, p. 337–46, jun. mar. 2000.

SHALEV, U.; GRIMM, J. W.; SHAHAM, Y. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine: a review. **Pharmacology Reviews**, v. 54, p.1–42, 2002

TARRIER, N.; SOMMERFIELD, C.; PILGRIM, H.; HUMPHREYS, L. Cognitive therapy or imaginal exposure in the treatment of post-traumatic stress disorder. Twelve-month follow-up. **The British Journal of Psychiatry**, v. 175, p. 571-5, dez. 1999.

UWAYA, A. et al. Acute immobilization stress following contextual fear conditioning reduces fear memory: timing is essential. **Behavioral and Brain Functions**, v. 12, n. 1, p. 8, jan. 2016.

WILBER, A. A.; WALKER, A. G.; SOUTHWOOD, C. J.; FARRELL, M. R.; LIN, G. L.; REBEC, G. V.; WELLMAN, C. L. Chronic stress alters neural activity in medial prefrontal cortex during retrieval of extinction. **Neuroscience**, v. 174, p. 115–31, fev. 2011.

WYNN, G. H. Complementary and Alternative Medicine Approaches in the Treatment of PTSD. **Current Psychiatry Reports**, v. 17, n. 62, jun. 2015.

YANG, Y. L.; CHAO, P. K.; LU, K. T. Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, 912-24, maio 2006.